家蝇 *MdSOD*3 基因的鉴定及其在抵抗重金属胁迫中的作用

唐　婷，高一夫，刘艳娟，葛旭东，李　响，柳峰松*
（河北大学生命科学学院，河北保定 071002）

摘要：超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化酶，在昆虫抗氧化保护过程中起着重要作用。本研究通过 RT-PCR 技术鉴定了家蝇 *Musca domestica MdSOD*3 基因(GenBank 登录号为 JQ408979)，cDNA 序列 817 bp，开放阅读框 534 bp，推导的多肽序列含有 177 个氨基酸。同源性分析及 NJ 法系统分析表明 *MdSOD*3 与其他物种的 Cu/ZnSOD 关系较近。荧光定量 PCR 检测该基因在家蝇幼虫脂肪体、肠、表皮和血细胞中不存在差异表达；在受到不同浓度重金属 Cd^{2+} 刺激时，*MdSOD*3 基因呈诱导性表达，5 mmol/L 时表达量最高。通过 RNAi 策略技术成功敲低 *MdSOD*3 表达水平。将 RNA 干扰 60 h 的幼虫置于 5 mmol/L Cd^{2+} 处理 24 h 后死亡率明显升高，并且出现中毒表象。NBT 活性染色检测到体外重组表达的 MdSOD3 具有明显的酶活性。结果提示 *MdSOD*3 基因可能在家蝇抗逆防御过程中起着重要作用。

关键词：家蝇；超氧化物歧化酶；基因相对定量；RNA 干扰；重金属胁迫
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2012)03-0267-09

Identification of the gene *MdSOD*3 and its role in resisting heavy metal stress in housefly (*Musca domestica*)

TANG Ting, GAO Yi-Fu, LIU Yan-Juan, GE Xu-Dong, LI Xiang, LIU Feng-Song* (College of Life Sciences, Hebei University, Baoding, Heibei 071002, China)

Abstract: As a member of the antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) plays a key role in insect antioxidant protection system. In this study, the full-length cDNA of a SOD gene *MdSOD*3 (GenBank accession no. JQ408979) from the housefly, *Musca domestica*, was cloned and characterized by RT-PCR, which is 817 bp in length, the open reading frame is 534 bp encoding 177 amino acid residues. The homologous alignment and phylogenetic tree indicate that the *MdSOD*3 from housefly belongs to Cu/ZnSOD family. The temporal expression profiling revealed that *MdSOD*3 was present in the fat body, gut, hemocytes and cuticle. The expression of *MdSOD*3 was enhanced by Cd stress. The highest expression level was found in treatment at 5 mmol/L Cd^{2+} within a 24 h period. Quantitative PCR (qPCR) showed that mRNA level of *MdSOD*3 gene was reduced compared to the control by RNAi. High mortality was observed in the larvae treated with dsRNA of *MdSOD*3 for 60 h at 5 mmol/L Cd stress for 24 h. The RNAi of *MdSOD*3 gene resulted in the larval abdominal apex to become black. The results suggest that *MdSOD*3 may play an important role in adapting to heavy metal stress in housefly.

Key words: *Musca domestica*; superoxide dismutase (SOD); quantitative PCR; RNAi; heavy metal stress

活性氧(reactive oxygen species, ROS)在昆虫先天免疫系统中具有重要作用(Yamamoto *et al*., 2005)，它包括超氧阴离子自由基($O_2^{\bullet -}$)、羟自由基($^{\bullet}OH$)、氢过氧基($HO_2^{\bullet}$)、烷氧基($RO^{\bullet}$)、烷过氧基($ROO^{\bullet}$)。ROS 能够激活信号转导以及调节细胞增长、凋亡等不同过程，生命体在正常代谢过程中产生 ROS，它的产生和清除维持着动态平衡。但是当生物体处于逆境胁迫条件时会打破 ROS 的动态平衡，使得细胞中 ROS 浓度升高，若不能及时清除过量 ROS 恢复平衡，则会引起生物膜的过氧化损伤，甚至对细胞的脂类、蛋白或 DNA 造成严重损伤(Jaramillo-Gutierrez *et al*., 2010)。

生命有机体在进化过程中形成并发展了清除 ROS 的系统，例如抗氧化酶系统和非酶性小分子抗

基金项目：河北大学自然科学基金项目(2011211)；国家自然科学基金项目(31101669)
作者简介：唐婷，女，1982 年生，广西来宾人，博士研究生，研究方向为无脊椎动物分子免疫学，E-mail: 10tangting@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: liufengsong@hbu.edu.cn
收稿日期 Received: 2011-12-21；接受日期 Accepted: 2012-02-24

氧化系统。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)属于抗氧化酶系统，在抗氧化过程中发挥了重要的调节功能，是有机体抵抗自由基或氧胁迫的第一道防线。一旦体内 ROS 浓度过量增加，SOD 被大量诱导生成，催化 ROS 发生歧化反应生成水和过氧化氢，最终消除 ROS，帮助机体适应环境，免受损伤。

SOD 是一种广泛存在于动植物和微生物中的金属酶，根据螯合的金属离子不同主要分为 3 类：MnSOD，FeSOD 和 Cu/ZnSOD。自 1939 年，Mann 和 Keilin 从牛血中分离出一种最初定名为血铜蛋白的金属蛋白，并由 McCord 和 Fridovich 于 1969 年根据该蛋白的酶活性特性定名为超氧化物歧化酶以来，人们对它的研究不断深入。SOD 被认为在生物体免疫及抗逆系统中具有重要作用。细菌、病毒感染、高温胁迫以及重金属均可诱导 SOD 的水平升高 (Kim *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2007)。尽管 SOD 在一些细菌、吸虫、鲍鱼、牡蛎以及对虾等物种中研究较为广泛，但是有关昆虫家蝇的 SOD 研究还相对较少。

家蝇 *Musca domestica* 隶属于昆虫纲(Insecta)，双翅目(Diptera)，是一种全球性分布的昆虫，对环境表现出很好的适应能力，可作为模式生物来研究动物的抗逆机制。本研究为了深入了解 SOD 在动物体内抵抗重金属胁迫过程中的作用，通过搜索本实验室测得的家蝇转录组数据库(Liu *et al*., 2012)，得到一条 *MdSOD*3 基因 EST 序列(由于该 EST 序列是本实验鉴定的第 3 个 SOD 基因，故将其命名为 *MdSOD*3)，分析了 *MdSOD*3 在 Cd^{2+} 胁迫条件下的表达模式，探讨了 *MdSOD*3 基因在家蝇抵抗重金属应答中的作用，并且体外表达了具有活性的 MdSOD3 蛋白。

1 材料和方法

1.1 试虫与试剂

1.1.1 供试虫源：家蝇 *M. domestica* 种蝇由中国科学院动物研究所何凤琴老师惠赠，已在室内饲养繁殖多代，种蝇饲养温度条件 25 ~ 30℃，空气相对湿度 70% 左右；饲料用 12% 的面粉和 80% 的水调匀煮成糊状，放置晾干后再加 8% 的糖化曲，60℃ 糖化 8 h，最后加入 1% 的血粉和黄粉虫粉。实验幼虫由本实验室饲养，饲养温度 25℃，相对湿度 50% ~ 70%。幼虫饲养成分为：55 g 麸皮、3 g 灭活酵母粉和 150 mL 水。成蝇饲养提供水、红糖、奶粉 (Codd *et al*., 2007)。

1.1.2 主要试剂与质粒菌种：RNAiso Plus、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、pMD18-T 载体、SYBR Green 为 TaKaRa 公司产品，M-MLV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶为北京全式金生物技术有限公司产品，引物为南京金斯瑞科技有限公司合成。L4440 质粒和 HT115 菌种由美国冷泉港实验室 Jennifer Aiello 博士惠赠。

1.2 家蝇幼虫组织样品制备

按照 Dong 等(2011)方法，解剖家蝇 3 龄幼虫分离出脂肪体、肠和表皮并收集血细胞。每一组织取 6 组平行，提取组织总 RNA。

1.3 家蝇幼虫重金属试验方法

参考 Tang 等(2011)方法，用不同浓度 $CdCl_2$ 溶液(0, 0.2, 0.8, 2, 5, 10, 20, 30 mmol/L)替代水拌家蝇幼虫饲料，取若干大小均一的 3 龄家蝇幼虫，处理 24 h 后各取 6 头分别提取总 RNA。

1.4 总 RNA 提取和反转录

按照使用说明书，用 RNAiso Plus (TaKaRa 公司)提取家蝇幼虫总 RNA，经琼脂糖凝胶电泳检测其完整性后，利用核酸定量仪测定其浓度和纯度，各取 2 μg 总 RNA，以 AOLP[5′-GGCCACGCGTCGACTAGTACT$_{16}$(G/A/C)-3′]为引物反转录合成 cDNA (Liu *et al*., 2005)。

1.5 家蝇 *MdSOD*3 基因克隆

按照 EST 序列信息设计上游引物 SOD-F1：5′-ACAAAACGGTCGGTTGAATT-3′，下游引物 SOD-R1：5′-CAAGCCACCCATGAAGAGAG-3′，以 cDNA 为模板克隆验证 *MdSOD*3 基因序列。反应程序为：94℃预变性 4 min；94℃变性 30 s，57℃退火 40 s，72℃延伸 1 min，30 个循环；最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物经电泳分离，切胶回收后连接 pMD18-T 载体，转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞，蓝白斑和 PCR 筛选阳性克隆后测序。

1.6 序列分析

将上述测序结果进行比对，利用 Bioedit 软件搜索开放阅读框，翻译成氨基酸序列，在 NCBI 网站上利用 Blastp 程序进行相似性比对。从 GenBank 下载其他已知昆虫 SOD 蛋白序列，利用 MEGA 4.0 软件对其进行多重比对，通过 NJ (neighbor-joining) 方法构建分子系统进化树。

1.7 qPCR 检测家蝇 *MdSOD*3 基因的表达定量

根据家蝇幼虫 *MdSOD*3 基因序列设计定量引物

SOD-F2：5′-TGTCGGCCAAATCAGCTGAG-3′和 SOD-R2：5′-TTCTCACCACAGGCATTCTG-3′，预期扩增片段大小为 109 bp，以组成型表达的 β-actin 基因作为内参基因（柳峰松等，2011），qPCR 检测家蝇幼虫不同组织表达丰度以及重金属刺激后家蝇幼虫体内 *MdSOD*3 随 Cd^{2+} 浓度的表达变化。qPCR 反应条件：95℃ 1 min；95℃ 20 s，60℃ 10 s，60℃实时采集荧光，共 45 个循环。测定溶解曲线的反应条件：60℃到 95℃，每升高 0.5℃停留 5 s，采集荧光。

1.8　构建 L4440 干扰载体

根据家蝇 *MdSOD*3 基因 ORF 设计干扰引物，上下游引物 5′端分别引入 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切位点（下划线标示）及保护碱基，上游引物 L-SODF：5′-CCGGAATTCATGGAAGCCATTGCCTATGT-3′，下游引物 L-SODR：5′-CCGCTCGAGTTACTAGCCAGTACGTCGAA-3′。同时设计绿色荧光蛋白（GFP）引物 L-GFPF：5′-CCGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3′，下游引物 L-GFPR：5′-CCGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3′。将扩增片段与 L4440 载体分别同时用 *Eco*R Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 进行双酶切并回收，将酶切后的片段和质粒进行连接后转化 DH5α 克隆宿主涂布于含有氨苄青霉素（终浓度 60 μg/mL）LB 固体培养平板上培养 12 h 后，挑取阳性菌落提取质粒进行 PCR 和双酶切检测，最后测序进行验证获得重组的干扰载体 L4440-SOD 和 L4440-GFP，其中 L4440-GFP 作为对照组。

1.9　dsRNA 诱导表达及干扰敲低实验

将构建好的干扰载体转化 HT115 宿主，通过 PCR 筛选阳性转化子。阳性转化子接种 100 mL 含有氨苄青霉素（终浓度 60 μg/mL）和四环素（终浓度 50 μg /mL）抗性的 LB 新鲜液体培养基，37℃振荡培养至 $OD_{600}=0.5$，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导 4 h。取 1 mL 菌液提取总 RNA，检测细菌 dsRNA 是否成功诱导表达。以 L4440 空载转化 HT115 宿主为对照，按照上述方法提取细菌总 RNA，最后进行电泳检测。

干扰敲低实验组中，4 000 r/min 10 min 离心收集诱导后的菌体弃培养基，150 mL 水重悬菌体备用。用 150 mL 干扰重悬菌代替水拌饲料，孵化家蝇卵，同时对照实验以含有 L4440-GFP 载体菌悬液替代。干扰 60 h 后，随机选取 6 头幼虫分别提取 RNA，合成 cDNA，通过定量引物 SOD-F2 和 SOD-R2，按照前述 qPCR 方法检测 *MdSOD*3 基因的 RNAi 处理后表达情况。

干扰 60 h 后将干扰实验组的家蝇幼虫放于含有 5 mmol/L Cd^{2+} 的培养基中饲养 24 h，每个实验点有 5 个平行，Cd^{2+} 饲养期间于 0，12 和 24 h，观察存活率变化。

1.10　构建原核表达载体

根据家蝇 *MdSOD*3 基因 ORF 设计原核表达引物，上下游引物 5′端分别引入 *Nde* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 酶切位点和保护碱基，上游引物 ExSODF：5′-GGAATTCCATATGATGGAAGCCATTGCCTATGT-3′，下游引物 ExSODR：5′-CGGAATTCTTACTAGCCAGTACGTCGAA-3′。以 cDNA 为模板，ExSODF 和 ExSODR 为引物进行 PCR 扩增。将扩增片段与 pET-17b 载体分别同时用 *Nde* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 进行双酶切并回收，将酶切后的片段和质粒进行连接后转化 DH5α 克隆宿主，经测序验证获得正确读码的重组表达质粒 r*MdSOD*3。

1.11　融合蛋白的原核表达

用重组质粒 r*MdSOD*3 转化大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞，同时以空载 pET-17b 质粒作为阴性对照。选取阳性克隆，在含有氨苄青霉素的液体 LB 培养基中于 37℃，200 r/min 摇菌至 OD_{600} 达 0.5 左右时，加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达，4 h 后取样进行 15% SDS-PAGE 以检测重组蛋白的表达情况。

1.12　rMdSOD3 蛋白纯化及活性检测

制备 15% SDS-PAGE 胶，直接将制备的样品加入不插梳子的浓缩胶进行电泳。电泳后用 250 mmol/L KCl 快速染色 30 min，用刀将目的条带切碎约 5 mm 长，将其放入透析袋（8 000 ~ 14 000 Da）中，透析袋两端用线绳捆绑封口，透析袋内注满 Tris-Gly 电解液，尽量赶出透析袋中的气泡。将准备好的透析袋放入 Tris-Gly 电解液的水平核酸电泳槽，100 V 稳压 3 h 后调换透析袋正负电极方向电泳 30 s，将透析袋轻轻取出收集透析袋中保留液，取适量进行 Native-PAGE 电泳检测。采用李建武等（2000）氮兰四唑（NBT）法检测纯化后的 MdSOD3 蛋白活性。

1.13　数据统计与分析

利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法（Livak and Schmittgen，2001），参照柳峰松等（2011）方法以整头幼虫表达量设为对照，计算 *MdSOD*3 在幼虫不同组织中的表达量；以正常条件下未经 Cd^{2+} 处理的幼虫 *MdSOD*3 表达量设为对照，计算 *MdSOD*3 在重金属胁迫条件下的表达量。分别计算出 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值和标准误（*SE*），使用

SPSS 13.0 软件进行 *t* 检验(n = 6)来比较处理组和对照组的差异。

2 结果

2.1 家蝇 *MdSOD*3 基因 cDNA 序列分析

经过 PCR 克隆测序验证，获得家蝇 *MdSOD*3 基因 cDNA 序列 817 bp，此序列包含 534 bp 完整的开放阅读框(ORF)，5′末端非翻译区 240 bp，3′末端非翻译区 43 bp(图 1)。推导的多肽序列含有 177 个氨基酸，理论分子量为 18.5 kD。在 NCBI 进行 Blastp 同源搜索，比对结果表明所得 MdSOD3 氨基酸序列与地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 氨基酸序列一致性(identity)最高(70%)，与家蝇 *M. domestica* MdCu/ZnSOD1 (GenBank 登录号：JF919738)氨基酸序列的一致性为 53%，与 MdMnSOD2 (GenBank 登录号：JF919739)氨基酸序列的一致性较低，仅为 14%，由于它是本实验鉴定的第 3 个 SOD 基因，故将其命名为 *MdSOD*3 (GenBank 登录号为 JQ408979)。

1 ACAAAACGGTCGGTTGAATTGATTCCAAAACTCAAAGTAAATATAGCAGCGCAACTCTTTCGGCTTAAATTCAATTCAATTTTCTTTCTGTGAATTGAAAAAAGCCAGTTAGTCTCGCGG
121 CCAGTTGAATTGATTTCAAGAACAGCAGCGATAACCATCACTATGAATGCTTGGCAATTGTTAATAACATTAATGGCCATTACGGCTGTGTCGGCCAAATCAGCTGAGAAAAATACCCGC
241 ATGGAAGCCATTGCCTATGTGACGGGACCCGTAGTTGTTGGCAATGTGACCTTCATACAGAATGCCTGTGGTGAGAATGTCCATGTTCACGTCAGTCCGGCCTGCTTGACACCGGGTAAA
1 M E A I A Y V T G P V V V G N V T F I Q N A C G E N V H V H V S P A C L T P G K
361 CATGGTTTCCATGTCCACGAGAAGGGAGATTTGTCTAATGGCTGTGCCAGTTTGGGAGGACATTTCAATCCCGATAAGATGGATCATGGCGGTCCCCGTGATGAGGTACGCCACGTTGGT
41 H G F H V H E K G D L S N G C A S L G G H F N P D K M D H G G P R D E V R H V G
481 GACTTGGGCAACATTGAGGCCAATGCCAATGGTGTCGTCGACACAACATTCACCGATCACTTGATCAGTTTGACGGGCAAACGAACAATCGTCGAACGCGGTTTGGTGGTGCACGAGGAG
81 D L G N I E A N A N G V V D T T F T D H L I S L T G K R T I V E R G L V V H E E
601 ATCGATGACCTTGGTAAAACTTGCCATCCCAATTCTAAAAAAACTGGTGATGCTGGTGGTCGTCTTGCTTGCGGCGTTATCGGTGTAAATGACGATTCGTGCCCTTGCGGTGATAGGTGG
121 I D D L G K T C H P N S K K T G D A G G R L A C G V I G V N D D S C P C G D R W
721 ATGATCGTATTAGCTTTAGCGGTTAAGCTGGTAATTCGACGTACTGGCTGGTAACTGTATTGGTCCAATTTTGTGCCCTCTCTTCATGGGTGGCTTG
161 M I V L A L A V K L V I R R T G W *

图 1 家蝇 *MdSOD*3 cDNA 及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The complete nucleotide and deduced amino acid sequences of *MdSOD*3 from *Musca domestica*

加方框 ATG 和 TAA 分别表示起始密码子和终止密码子。The boxed ATG and TAA indicate the start codon and the stop codon, respectively.

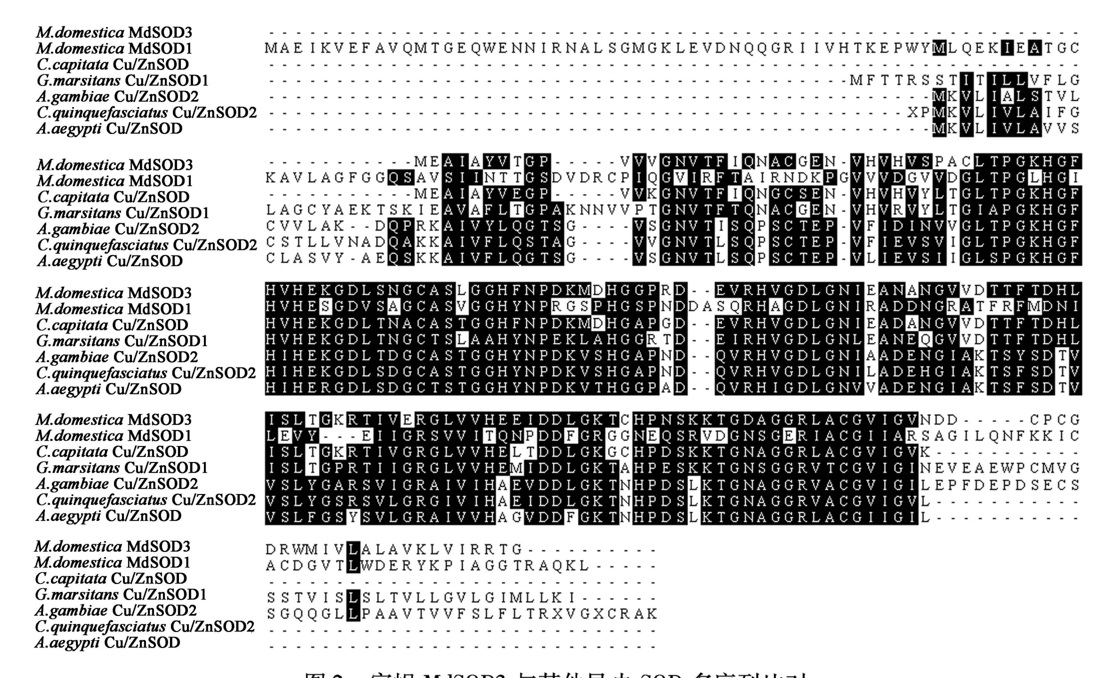


图 2 家蝇 MdSOD3 与其他昆虫 SOD 多序列比对

Fig. 2 Multiple alignment of amino acid sequences of MdSOD3 with SODs from other insect species

SOD 序列及其在 GenBank 中的登录号 The SOD sequences and their GenBank accession numbers：家蝇 *Musca domestica* MdSOD3 (JQ408979)；家蝇 *Musca domestica* MdCu/ZnSOD1 (JF919738)；地中海实蝇 *Ceratitis capitata* Cu/ZnSOD (AAC37228)；刺舌蝇 *Glossina morsitans* Cu/ZnSOD1 (ADD19264)；冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* Cu/ZnSOD2 (AAS17758)；致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* Cu/ZnSOD2 (XP_001841816)；埃及伊蚊 *Aedes aegypti* Cu/ZnSOD (XP_001651859).

*MdSOD*3 基因编码的蛋白与双翅目其他昆虫的 SOD 有较高的相似性，应用 Clustal W 程序对几种双翅目的 SOD 进行多序列比对（图 2）。利用 MEGA 4.0 软件对 Cu/ZnSOD 和 MnSOD 等多肽序列以 NJ 法构建的系统关系表明：本实验得到的家蝇 MdSOD3 和其他物种的 Cu/ZnSOD 聚在一起，明显区别于 MnSOD，推测本实验得到的家蝇 MdSOD3 属于 SOD 家族 Cu/ZnSOD 分支（图 3）。

2.2 *MdSOD*3 基因的表达定量

应用 qPCR 技术检测 *MdSOD*3 基因相对表达量时，发现溶解曲线尖锐单一，说明内参基因和目的基因扩增特异性较好（图 4：A，B）。组织特异性表达分析结果表明，*MdSOD*3 基因在家蝇脂肪体、肠、表皮和血细胞均有表达，各组织表达量与整头幼虫中的表达量无显著性差异（$P > 0.05$）（图 5）。不同 Cd^{2+} 浓度投喂家蝇幼虫 24 h 检测结果显示，5 mmol/L Cd^{2+} 诱导 24 h 后 *MdSOD*3 表达量显著高于对照组（$P < 0.01$），达到一个高峰，随后趋势变化缓慢，但表达量仍然高于对照组（图 6）。

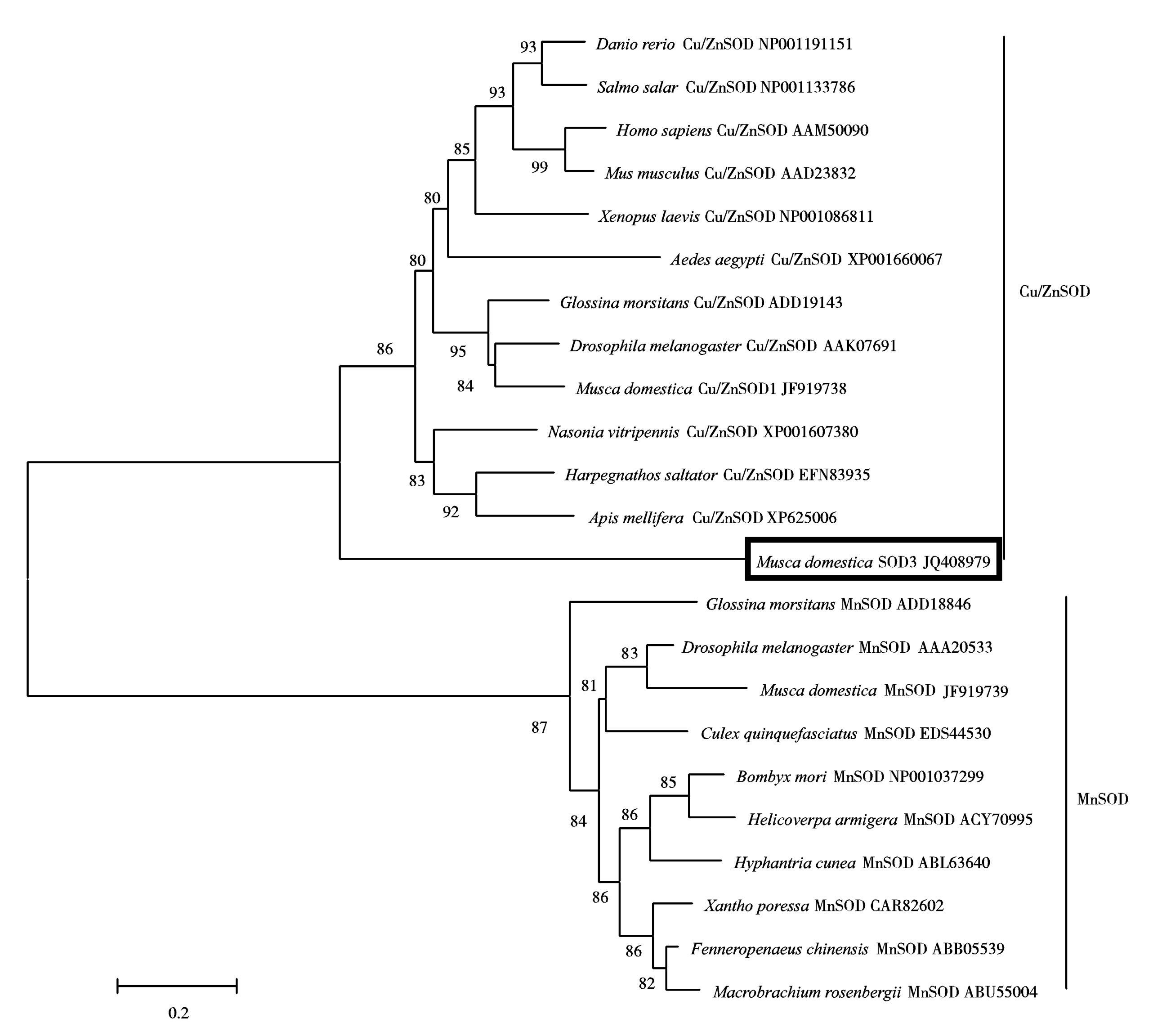


图 3 家蝇与其他物种基于 SOD 氨基酸序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences of SODs from *Musca domestica* and other insects

物种拉丁名后为序列名及该序列 GenBank 登录号。Following the species name are the sequence name and its GenBank accession number.

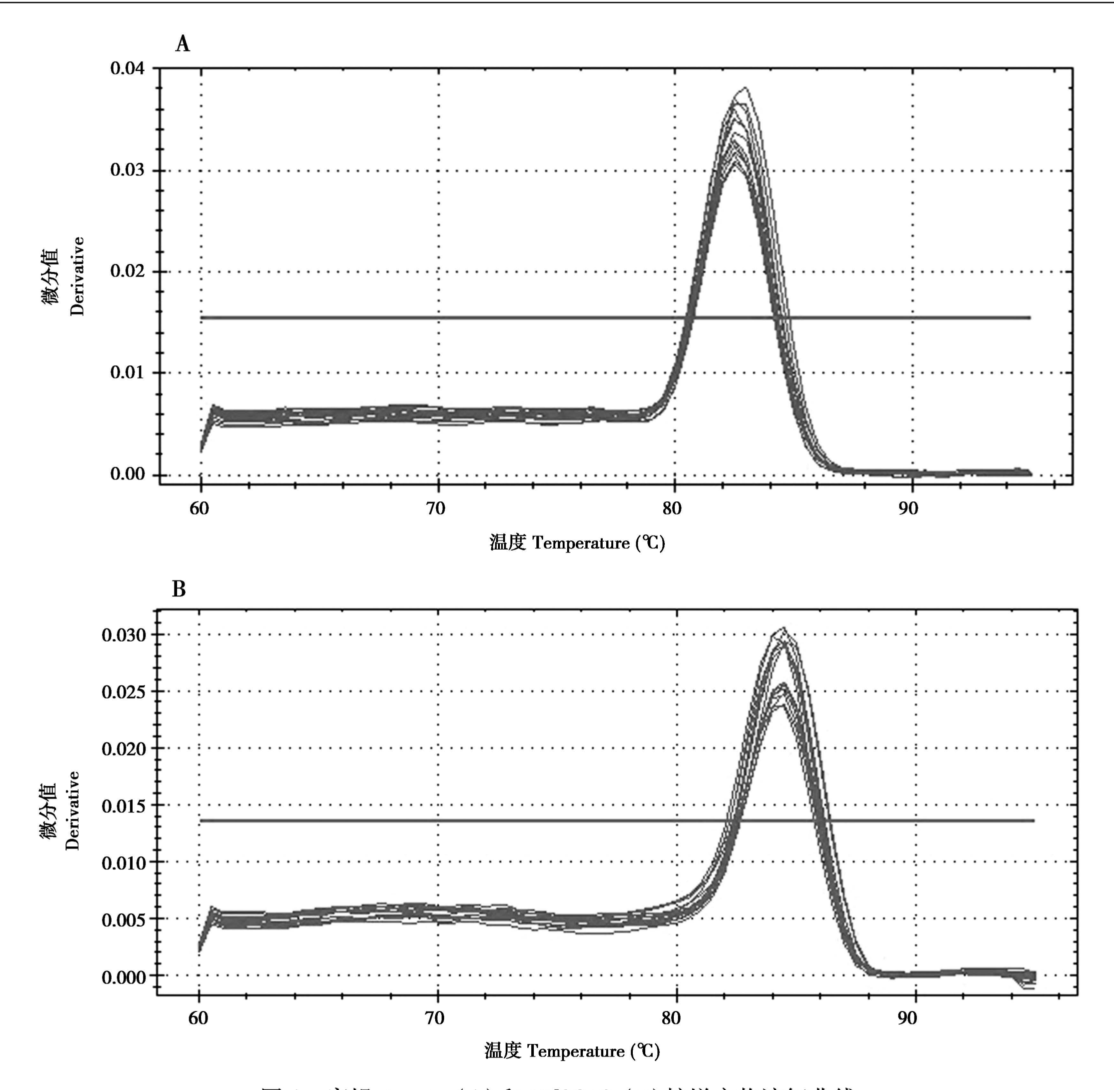


图 4 家蝇 *β-actin*（A）和 *MdSOD3*（B）扩增产物溶解曲线

Fig. 4 Melting curve of the PCR products of *β-actin* (A) and *MdSOD3* (B) from *Musca domestica*

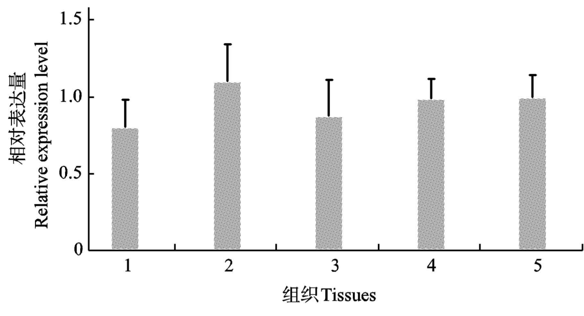


图 5 家蝇 3 龄幼虫 *MdSOD3* 基因在不同组织中的表达分析

Fig. 5 *MdSOD3* transcripts in different tissues from the 3rd instar larvae of *Musca domestica*

1：脂肪体 Fat body；2：肠 Gut；3：表皮 Cuticle；4：血细胞 Hemocytes；5：整虫 Whole body. 不同处理实验组与对照组间无显著差异（*t* 检验分析）。No significant difference was observed between different tissues and whole body (*t* test).

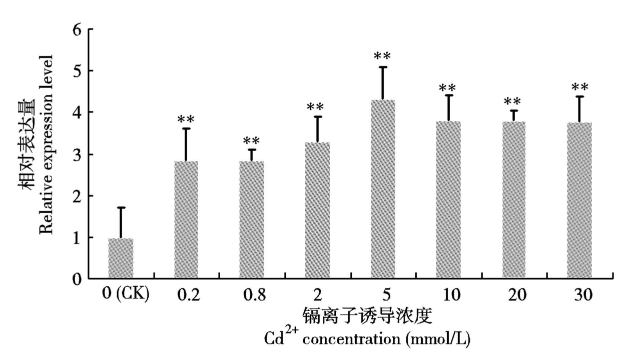


图 6 不同 Cd^{2+} 浓度刺激家蝇 3 龄幼虫 24 h 后 *MdSOD3* 基因的表达分析

Fig. 6 Relative expression level of *MdSOD3* in 3rd instar larvae of *Musca domestica* exposed to different concentrations of cadmium for 24 h

**：不同处理实验组与未处理对照组间存在极显著差异（$P<0.01$，*t* 检验）Extremely significant difference between different treatment groups and control at the 0.01 level (*t* test). 图 8 和图 9 同 The same for Figs. 8 and 9.

2.3　敲低水平检测及 RNA 干扰结果

将成功构建的 L4440-SOD 载体转化 HT115 菌株进行表达，取少量菌液用于总 RNA 提取。电泳结果显示诱导前后的菌体 RNA 有一条明显差异条带，由此推测出现的差异条带是诱导表达的 *MdSOD*3 dsRNA（图 7）。双蒸水重悬湿菌，用于 RNAi 投喂干扰实验。干扰后的定量结果表明，投喂 L4440-SOD 对应的实验组 *MdSOD*3 表达量明显低于 L4440-GFP 对应的实验组（图 8）。投喂干扰 60 h 后的家蝇幼虫置于 5 mmol/L Cd^{2+} 胁迫环境下处理 24 h，家蝇幼虫死亡率较实验对照组明显升高，干扰组死亡率达 70%，实验对照组正常仅为 5%（图 9）。且观察到干扰组死亡的虫体尾部多呈现深黑色（图 10）。

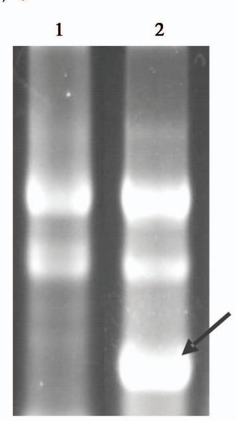


图 7　*MdSOD*3 双链 RNA 的诱导表达

Fig. 7　The induction of dsRNA of *MdSOD*3

1：L4440 菌液诱导 RNA 电泳 The RNA extract of L4440 after induction；2：L4440-SOD 菌液诱导 RNA 电泳 The RNA extract of L4440-SOD after induction.

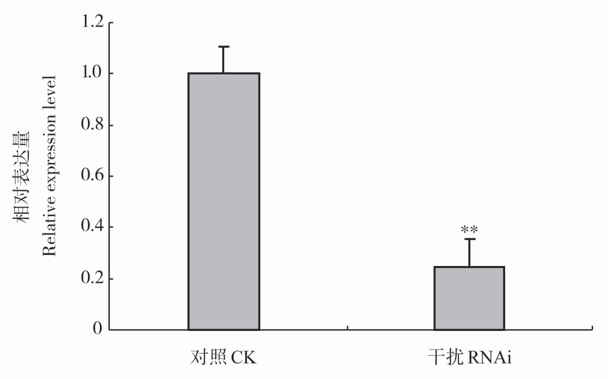


图 8　投喂双链 RNA 菌液 60 h 后家蝇 *MdSOD*3 基因敲除表达分析

Fig. 8　Knock-down of *MdSOD*3 expression by ingestion of bacteria expressing dsRNA for 60 h

对照 CK：投喂 L4440-GFP 的实验组 Feeding L4440-GFP dsRNA；干扰 RNAi：投喂 L4440-SOD 的实验组 Feeding L4440-SOD dsRNA.

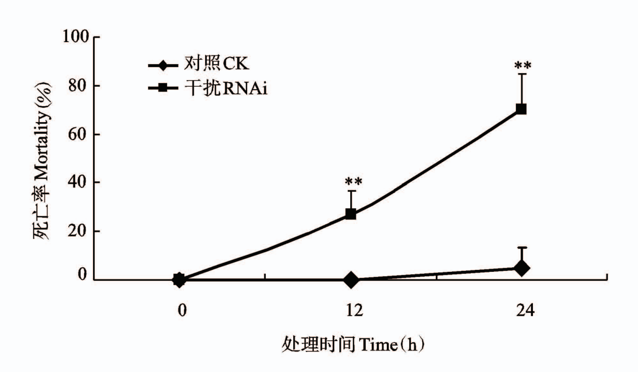


图 9　RNAi 干扰 60 h 后 Cd^{2+} 处理 24 h 家蝇死亡率变化

Fig. 9　Changes in mortality rate of housefly after RNAi treatment for 60 h and then exposed to Cd^{2+} for 24 h

对照 CK：投喂 L4440-GFP 的实验组 Feeding L4440-GFP dsRNA；干扰 RNAi：投喂 L4440-SOD 的实验组 Feeding L4440-SOD dsRNA.

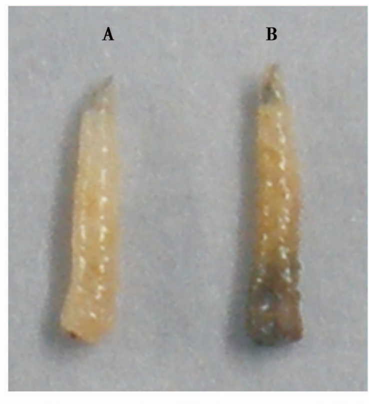


图 10　RNAi 干扰 60 h 后 Cd^{2+} 处理 24 h 虫体外部形态变化

Fig. 10　The phenotypes of housefly after RNAi treatment for 60 h and then exposed to Cd^{2+} for 24 h

A：取食 GFP 双链 RNA 的虫体 Larva treated with dsRNA of GFP；B：取食 *MdSOD*3 双链 RNA 的虫体 Larva treated with dsRNA of *MdSOD*3.

2.4　家蝇 MdSOD3 蛋白原核表达及活性检测

rMdSOD3 重组质粒的表达宿主菌经 IPTG 诱导 4 h，SDS-PAGE 电泳结果显示在 18.5 kD 左右有明显的诱导带，而转化对照 pET-17b 质粒菌体在对应位置没有明显的诱导带，说明 rMdSOD3 蛋白在宿主菌中大量表达（图 11）。

取 20 μL 电透析纯化的蛋白进行 Native-PAGE 电泳，电泳后分别进行考马斯亮蓝染色和 NBT 活性染色。染色后结果显示电透析纯化得到的蛋白条带单一（图 12：A），并且 NBT 染色显示其对应位置的 rMdSOD3 蛋白具有酶活性（图 12：B）。

3　讨论

家蝇在昆虫生理学和生物化学研究中具有显著

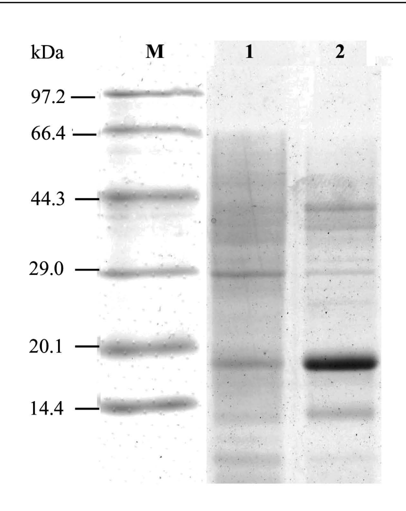


图 11 rMdSOD3 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 11 SDS-PAGE analysis of rMdSOD3 protein

M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker；1：诱导含 pET-17b 质粒的转化菌 Induced *Escherichia coli* containing pET-17b；2：诱导含 r*MdSOD*3 质粒的转化菌 Induced *E. coli* containing r*MdSOD*3.

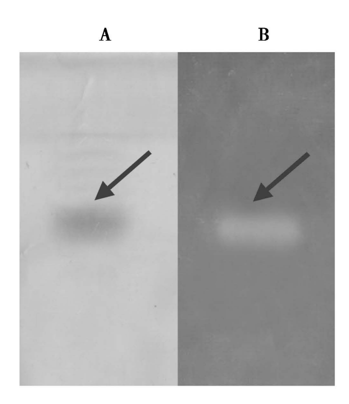


图 12 纯化 rMdSOD3 蛋白的 Native-PAGE 电泳

Fig. 12 Native-PAGE analysis of the purified protein of rMdSOD3

A：考马斯亮蓝染色 Stained by Commassie blue；B：NBT 染色 Stained by NBT.

的优越性，例如抗逆（Shopova *et al.*，2009）和免疫学研究（Ren *et al.*，2009；Lu *et al.*，2010）领域。本实验从家蝇转录组数据库中鉴定了 *MdSOD*3 基因，推测其属于 SOD 家族 Cu/ZnSOD 分支，是抗氧化酶系统中重要成员，对研究家蝇的抗逆体系具有重要意义。

*MdSOD*3 基因在不同物种组织中的表达情况不尽相同。对红光熊蜂 *Bombus ignitus* 的 Northern 印迹研究发现 SOD 在脂肪体、中肠、肌肉和头部均有表达（Choi *et al.*，2006），栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 的血细胞、肠、肌肉和性腺均可检测到 SOD 的表达（Ni *et al.*，2007）。本研究发现 *MdSOD*3 在家蝇幼虫的脂肪体、肠、表皮和血细胞均有表达，不存在组织特异性，而且在被检测组织中表达量无显著差异。

当生物体遭受胁迫时，会引起体内 ROS 浓度骤增，SOD 的生成可以消除过量 ROS，维持浓度平衡。家蝇幼虫 *MdSOD*3 在 0.2 ~ 30 mmol/L Cd^{2+} 处理 24 h 后均显著上调表达，说明 *MdSOD*3 对镉胁迫具有特异反应。Pruski 和 Dixon（2002）认为 Cd^{2+} 能够和体内重要的金属离子竞争蛋白活性位点，导致 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 释放从而引起 ROS 大量生成（Xu *et al.*，2011），并造成某些组织器官发生脂质过氧化。ROS 指标升高或是组织受到过氧化，都会激活 SOD 或是其他抗氧化防御系统进行调节（Dabas *et al.*，2012）。实验结果显示，低浓度的 Cd^{2+}（0.2 mmol/L）可以诱导 *MdSOD*3 表达，并在 5 mmol/L 浓度下达到一个高峰，尽管随后浓度增加，但是并未检测到 *MdSOD*3 表达量继续升高的趋势。推测可能原因是高浓度的 Cd^{2+} 引起生理代谢功能紊乱，机能逐渐衰竭使得基因的表达量受到影响。为了进一步验证 *MdSOD*3 基因在家蝇幼虫抵抗 Cd^{2+} 重金属刺激过程中的作用，我们运用 RNAi 策略技术成功获得 *MdSOD*3 敲低的家蝇幼虫，其在 Cd^{2+} 刺激下存活率明显下降，同时观察到个体尾部发黑的生物学表象，推测是由于 *MdSOD*3 表达敲低或是 *MdSOD*3 所在调控通路阻断造成的 Cd^{2+} 中毒现象。实验结果提示 *MdSOD*3 不仅在抗氧化防御系统中，而且有可能在抗逆应激作用过程中，通过高表达减轻重金属离子毒性对机体的伤害，以及在整个机体的抗逆功能等方面起着重要的作用。

在大肠杆菌 *E. coli* 中对高等生物功能基因进行重组表达时，很多重组蛋白不能进行正确折叠从而失去体内蛋白原始的三级空间结构和活性。本实验利用电透析的方法纯化并得到具有酶活性的 MdSOD3 蛋白，通过体外表达即可检测到该蛋白的活性，由此推测 *MdSOD*3 在家蝇体内的活性应该高于体外活性，同时也提示 *MdSOD*3 在家蝇体内可能具有极高的抗氧化活性，能在消除应激引起的氧化压力中起重要作用。

参考文献（References）

Choi YS, Lee KS, Yoon HJ, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2006. *Bombus ignitus* Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1): cDNA cloning, gene structure, and up-regulation in response to paraquat, temperature stress, or lipopolysaccharide stimulation. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 144: 365 – 371.

Codd V, Dolezel D, Stehlik J, Piccin A, Garner KJ, Racey SN,

Straatman KR, Louis EJ, Costa R, Sauman I, Kyriacou CP, Rosato E, 2007. Circadian rhythm gene regulation in the housefly *Musca domestica*. *Genetics*, 177: 1539 – 1551.

Dabas A, Nagpure NS, Kumar R, Kushwaha B, Kumar P, Lakra WS, 2012. Assessment of tissue-specific effect of cadmium on antioxidant defense system and lipid peroxidation in freshwater murrel, *Channa punctatus*. *Fish Physiol. Biochem*., 38(2): 469 – 482.

Dong X, Liu F, Zhang D, Tang T, Ge X, 2011. Identification and characterization of the cysteine protease inhibitor gene *MdCPI* from *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol*., 20: 577 – 586.

Jaramillo-Gutierrez G, Molina-Cruz A, Kumar S, Barillas-Mury C, 2010. The *Anopheles gambiae* oxidation resistance 1 (OXR1) gene regulates expression of enzymes that detoxify reactive oxygen species. *PLoS ONE*, 5: e11168.

Kim KY, Lee SY, Cho YS, Bang IC, Kim KH, Kim DS, Nam YK, 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc-and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish Shellfish Immunol*., 23: 1043 – 1059.

Li JW, Xiao NQ, Yu RY, Yuan MX, Chen LR, Chen YH, Chen LT, 1994. Principles and Methods of Biochemical Experiment . Peking University Press, Beijing. 324 – 326. [李建武，萧能(庚心)，余瑞元，袁明秀，陈丽蓉，陈雅蕙，陈来同，1994. 生物化学实验原理和方法. 北京：北京大学出版社. 324 – 326.]

Liu F, Liu Y, Li F, Dong B, Xiang J, 2005. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mar. Biotechnol*., 7: 600 – 608.

Liu F, Tang T, Sun L, Jose Priya TA, 2012. Transcriptomic analysis of the housefly (*Musca domestica*) larva using massively parallel pyrosequencing. *Mol. Biol. Rep*., 39: 1927 – 1934.

Liu FS, Sun LL, Tang T, Wang LN, 2011. Cloning, sequence analysis and induced expression of attacin-2 gene in housefly (*Musca domestica*). *Acta Entomologica Sinica*, 54(1): 27 – 33. [柳峰松，孙玲玲，唐婷，王丽娜，2011. 家蝇抗菌肽 Attacin-2 基因的克隆、序列分析和诱导表达. 昆虫学报，54(1): 27 – 33]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\text{Delta Delta C(T)})}$ method. *Methods*, 25: 402 – 408.

Lu XM, Jin XB, Zhu JY, Mei HF, Ma Y, Chu FJ, Wang Y, Li XB, 2010. Expression of the antimicrobial peptide cecropin fused with human lysozyme in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 87: 2169 – 2176.

Ni D, Song L, Gao Q, Wu L, Yu Y, Zhao J, Qiu L, Zhang H, Shi F, 2007. The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol*., 23: 1032 – 1042.

Pruski AM, Dixon DR, 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat. Toxicol*., 57: 127 – 137.

Ren Q, Zhao X, Wang J, 2009. Molecular characterization and expression analysis of a chicken-type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*). *J. Genet. Genomics*, 36: 7 – 16.

Shopova VL, Dancheva VY, Salovsky PT, Stoyanova AM, 2009. Protective effects of a superoxide dismutase/catalase mimetic compound against paraquat pneumotoxicity in rat lung. *Respirology*, 14: 504 – 510.

Tang T, Huang DW, Zhang D, Wu YJ, Murphy RW, Liu FS, 2011. Identification of two metallothionein genes and their roles in stress responses of *Musca domestica* toward hyperthermy and cadmium tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*., 160: 81 – 88.

Xu H, Song P, Gu W, Yang Z, 2011. Effects of heavy metals on production of thiol compounds and antioxidant enzymes in *Agaricus bisporus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*., 74: 1685 – 1692.

Yamamoto K, Zhang P, Banno Y, Fujii H, 2005. Superoxide dismutase from the silkworm, *Bombyx mori* sequence, distribution, and overexpression. *Biosci*., *Biotechnol. Biochem*., 69: 507 – 514.

Zhang Q, Li F, Wang B, Zhang J, Liu Y, Zhou Q, Xiang J, 2007. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression. *Dev. Comp. Immunol*., 31: 429 – 440.

（责任编辑：赵利辉）